

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДСВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ  
Hsp 70 С ПЕПТИДНЫМ ЭКСТРАКТОМ ПОЧЕК

И.П.Кайдашев, В.Н.Соколенко

Украинская медицинская стоматологическая академия,  
г.Полтава

Многочисленными исследованиями прошлых лет [1,2,5,6,11] было продемонстрировано, что пептидный экстракт почек, полученный по оригинальной методике [1,7], обладает значительной биологической активностью. Пептидный комплекс почек обладает иммуномодулирующим действием, проявляет высокую регенераторную активность и влияет на биосинтез ДНК в органоспецифической манере. Доказано выраженное действие пептидного комплекса на обмен веществ в тканях почек в условиях интоксикации (этиленгликоль, фторид натрия и т.д.) [3] и восстановление иммунной толерантности при аутоиммунной патологии (нефрит Хеймана, сывороточная болезнь) [4,8,11]. Если сегодня спектр биологических активностей пептидного комплекса почек изучен достаточно полно, то вопрос, касающийся механизмов действия таких пептидом, по-прежнему далек от своего разрешения. Одним из ключевых аспектов понимания механизма действия пептидов, экстрагированных из тканей, является процесс трансдукции пептидного сигнала. В общем, проблема сводится к поиску мембранных молекул, которые способны связывать пептидные и/или полипептидные молекулы. На роль пептидсвязывающих молекул могут претендовать иммуноглобулины, молекулы главного комплекса гистосовместимости, молекулярные шапероны и специфические рецепторы [5]. Наше внимание привлекла группа молекулярных шаперонов благодаря, во-первых, их достаточно широкой аминокислотной специфичности [9], во-вторых, их несобъяснимо присутствию на внешних клеточных мембранах [10].

Таким образом, целью данной работы явилось доказательство факта взаимодействия между пептидными молекулами и молекулами молекулярных шаперонов Hsp 70, выделенными из тканей почек.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пептидные комплексы выделяли из тканей почек по методике [1,7]. Для выделения молекулярных шаперонов Hsp 70 были

использованы почки мышей BALB/c, которые забирались на холоду, а затем гомогенизировались в гипотоническом буфере 30 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 мМ PMSF, pH 7,4 [4,13]. После этого был получен 100000 г супернатант, который был ступенчато преципитирован сульфатом аммония. Фракции соответствующие 50-70 % сульфата аммония были обессолены с помощью патронов "Centricon-30" (Amicon Corp., Danvers MA) и отмыты 0,15 М раствором натрия хлорида на бидистиллированной воде. Затем полученный экстракт Hsp 70 был обработан дважды 10 мМ АТФ в течении 30 минут на патронах "Centricon-10". Экстракты пептидов, которые были связаны с Hsp 70 были собраны и сконцентрированы под вакуумом Speed Vac (Savant Instruments Ins., Farmingdale, NY) и перерастворены в 0,1 % растворе трифторуксусной кислоты (ТФУ) (Fluka). Пептидные экстракты анализировались методом ВЭЖХ на хроматографе SMART tm SYSTEM, LKB, "Pharmacia", Sweden. Колонка RCP C-2/C18-SC 2.1/10, градиентная подача элюента от 10 до 100 % раствора В в А (раствор А - 0,1 % ТФУ; раствор В - 0,085 % ТФУ в 80 % ацетонитриле) за 80 минут, детекция при 214 и 280 нм. К отмывке от АТФ "пустым" молекулам Hsp 70 был добавлен пептидный комплекс почек и после 30 минут инкубации не связавшиеся пептиды были отмыты 0,15 М хлорида натрия. После чего была проведена экстракция связавшихся пептидов 10 мМ АТФ. Экстракты анализировались как описано выше.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Представители семейства молекулярных шаперонов Hsp 70 связывают свои пептидные лиганды в АТФ-зависимой манере, поэтому нами была выбрана экстракция пептидов из комплекса с Hsp 70 с помощью АТФ, что по сравнению с обычной кислотной экстракцией (например, трифторуксусной кислотой) позволяет выполнить экстракцию специфично и сохранить Hsp 70 в неденатурированной форме [9,13].

Экстракция нативного комплекса пептиды-Hsp 70 10 мМ АТФ приводит к вытеснению эндогенных пептидов. Как показала хроматограмма Hsp 70 содержат достаточно гидрофобную группу пептидов со временем удерживания 50-70 минут. Это согласуется с данными мотива связываемых пептидов для шаперонов BiP, DnaK и т.д., основанного на наличии якорных аминокислот с большими гидрофобными или ароматическими боковыми цепями (Trp, Phe,

Leu, Ile) [9,12].

При хроматографическом анализе экзогенного пептидного комплекса почек после инкубации с "пустыми" молекулами Hsp 70 нами обнаружено присутствие нескольких пептидных фракций в области 60-65 минут. Таким образом, можно сделать вывод, что "пустые" молекулы молекулярных шаперонов Hsp 70 способны взаимодействовать с отдельными фракциями пептидного комплекса коркового вещества почек. Учитывая, что в исследованиях использовались препараты Hsp 70 не только мембранного пула, но и в большей степени внутриклеточные, можно с достоверностью утверждать лишь о факте взаимодействия между молекулярными шаперонами Hsp 70 и компонентами пептидного комплекса. Это дает основания предполагать, что молекулярные шапероны Hsp 70 могут принимать участие в рецепции, а затем и в реализации пептидного сигнала. Принимая во внимание достаточно невысокую субстратную специфичность представителей семейства Hsp 70, можно думать об участии этих шаперонов в реализации действия многих классов регуляторных пептидов - нейропептидов, пептидных гормонов, цитомединов, тетинов и т.д. Представляется целесообразным дальнейшее изучение процессов взаимодействия шаперонов с регуляторными пептидами, кинетики этого процесса, биологических последствий.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кайдашев И.П., Силенко Ю.И., Мищенко В.П., Хавинсон В.Х. Влияние почечных пептидов-цитомединов на гемокоагуляцию и перекисное окисление липидов при экспериментальном нефрите Хеймана//Патофизиология.-1991.- N 5.- С.35-36.

2. Кайдашев І.П. Відновлення пептидергічної регуляції у нирках екзогенними поліпептидними речовинами ренального походження//Фізіологічний журнал.- 1992.- Т.38, №6.- С.106-109.

3. Кайдашев І.П., Катрушов О.В., Міщенко В.П. Вплив регуляторних ниркових поліпептидів на гемокоагуляцію та перекисне окислення ліпідів при фтористій інтоксикації//Фізіологічний журнал.- 1993.- Т.39, №2-3.- С.67-71.

4. Кайдашев И.П. Влияние почечных полипептидов на активность лимфоцитов при экспериментальном нефрите//Физиологический журнал.- 1993.- Т.39, N 5-6.- С.52-56.

5. Кайдашев І.П. Механізми утворення та дії поліпептидних

біорегуляторів-цитомедінів//Фізіол. журн.-1994.-Т.40, N1.- С.51-63.

6. Кайдашев И.П. Вивчення специфічної дії пептидного комплексу нирок під час унілатеральної нефректомії з алоста-тичною трансплантацією нирки у щурів//ФАРМАКОМ.- 1995.- N11-12.- С.31-37.

7. Кайдашев И.П. Сравнительное изучение хроматографических спектров полипептидов, экстрагированных из селезенки, печени, почек, тимуса и пародонта свиней//Укр.биохим.журн.- 1995.- Т.67, N 5.- С.85-89.

8. Кайдашев И.П. Влияние полипептидного комплекса тканей почек на активность лимфоцитов донорской крови//Иммунология.- 1995.- N 4.- С.31-33.

9. Blond-Elguindi S., Fourie A.M., Sambrook J.F., Getting M.J.H. Peptide-dependent stimulation of ATPase activity of the molecular chaperone BiP is the result of conversion of oligomers to active monomers//J. Biol. Chem.-1993. - 268.-P. 12730-12735.

10. DeNagel D.C., Pierce S.K. A case for chaperones in antigen processing//Immunology Today.-1992.-V.13.-N3.-P.86-89.

11. Kaidashev I.P. Consensus sequence of peptide fractions' pool obtained from kidney' cortex substances and its immunoregulative influence//European J. Physiol.-1995.- V.430, N4.- P.48.

12. Landry S.J., Jordan R., McMacken R., Gierash L.M. Different conformations for the same polypeptide bound to chaperones DnaK and GroEL//Nature.-1992.-355.-P.455-457.

13. Udono H., Srivastava P.K. Heat Shock Protein 70-associated Peptides Elicit Specific Cancer Immunity//J.Exp. Med.-1993.-V.178.-P.1391-1394.